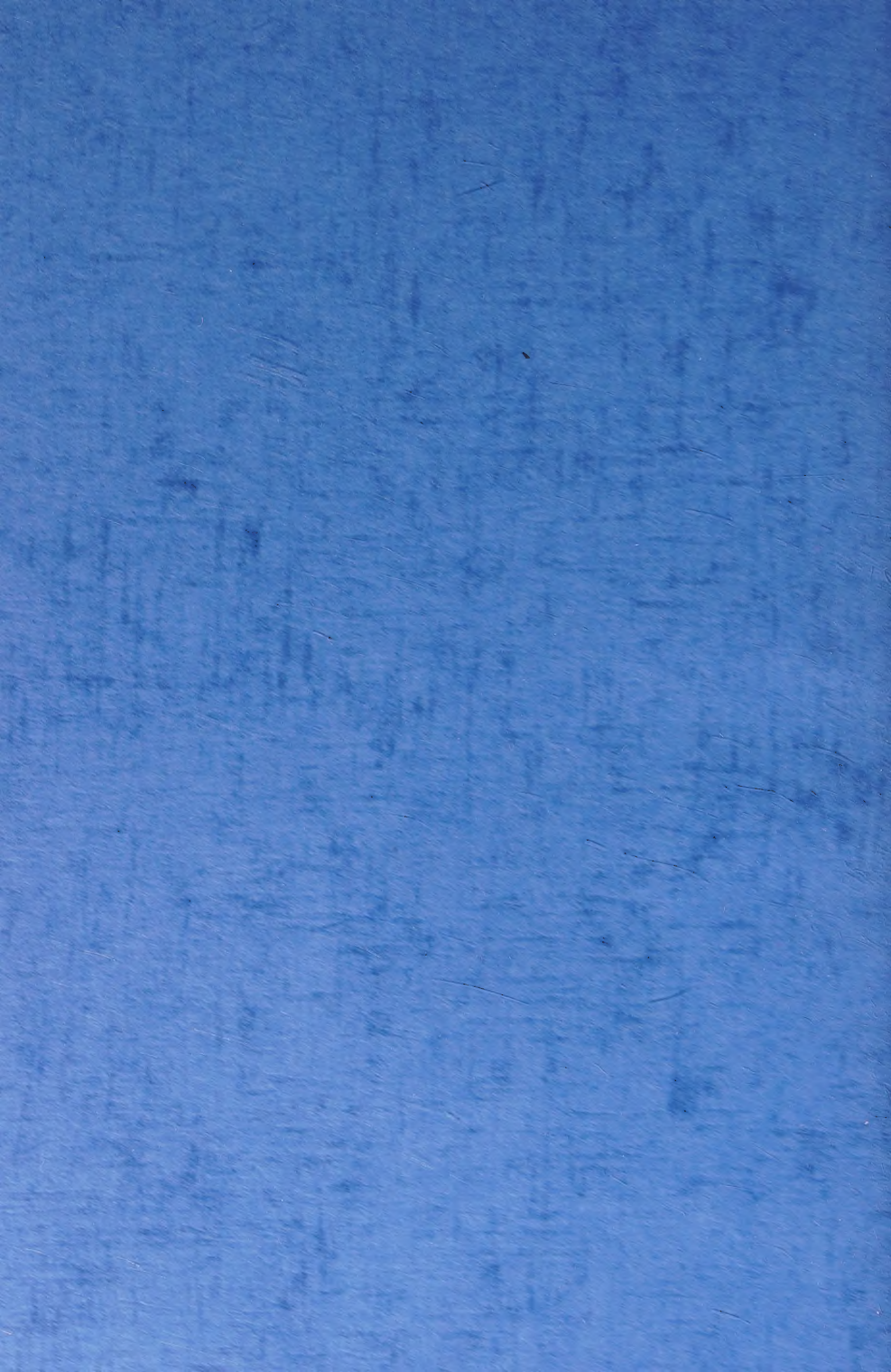


**BEEINFLUSSUNG DER
LYMPHOZYTENSTIMULATION IM
TIEREXPERIMENT IN GEGENWART VON
NOVOCAIN UND EINEM VITAMINKOMPLEX
ALS STRAHLENSCHUTZSUBSTANZEN**

Klaus Bauer

1976





Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41555611_0082

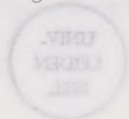
Strahlentherapeutische Klinik, Institut für
Klinische Strahlenbiologie der Universität Wien
Vorstand: Prof.Dr.K.H.Kärcher

Institut für Klinische Chemie,
Kommissarischer Leiter: Prof.Dr.A.Fritz

Labor für Klinische Biochemie,
Leiter: Prof.Dr.K.Hochstraßer, HNO-Klinik der
Universität München

BEEINFLUSSUNG DER LYMPHOZYTENSTIMULATION
IM TIEREXPERIMENT IN GEGENWART VON NOVOCAIN UND EINEM
VITAMINKOMPLEX ALS STRAHLENSCHUTZSUBSTANZEN

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig-Maximilians-Universität zu München



vorgelegt von
Klaus Bauer
aus
Köln
1976

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter : Prof. Dr. K.H.Kärcher

Mitberichterstatter : Prof. Dr. A.Fritz

Dekan : Prof. Dr. W.Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 14. 12. 1976



INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
A Einleitung	1
B Fragestellung	3
C Wirkung von PHA	5
D Besprechung der Literatur	7
- Strahlensensitivität -	
- elementare Strahlenschäden -	
Inaktivierung von Proteinen, Schädigung	
der DNA, Störung der Mitoseaktivitäten,	
Störung der Lymphozytenfunktion	
- Wirkungsmechanismus strahlenschützender	11
Substanzen	
- Novocain -	13
- Vitaminkomplex -	14
E Spezielle Fragestellung	18
F Methodik	19
1. Erklärung des Verfahrens der Impuls-	22
cytophotometrie	
2. Auswertungsmethodik der Histogramme	23
G Ergebnisse	26
H Diskussion	32
I Zusammenfassung	35
J Literaturverzeichnis	37

A EINLEITUNG

Neuere Erkenntnisse auf dem Gebiet der Transplantationsimmunologie haben ergeben, daß maligne Zellen Träger sogenannter Tumorantigene sein können. Unser Organismus reagiert darauf mit einer spezifischen Immunreaktion, mit dem Ziel, die Entstehung oder das Wachstum zu verhindern. (1)

(2)

Bei dieser immunologischen Tumorabwehrreaktion handelt es sich im Prinzip um die gleichen Vorgänge, wie sie sich auch bei Kontakt mit anderen Antigenreizen in Erscheinung treten. Träger dieser Immunabwehr sind die Lymphozyten, wobei man unterscheidet zwischen B-Zellen für die humorale Abwehr und T-Zellen für die sessile celluläre Immunantwort. Letztere besitzen für die Tumorabwehr die größere Bedeutung. Der biologische Sinn tumorspezifischer Immunreaktion liegt in einer ständigen Überwachung und Eliminierung maligne entarteter Zellen. (4)

Bei Tumorkranken, die sich einer Strahlentherapie unterziehen, kommt es zu einer dauernden oder zeitweisen Unterdrückung des Immunsystems, da die Lymphozyten selektiv und nachhaltig geschädigt werden. Vor allem die T-Lymphozyten haben sich als

äußerst strahlenempfindlich erwiesen. (5)

Es kommt 24 Stunden p.r. (3) zu einem "Lymphozytensturz", wobei nach 12 Wochen die absolute Lymphozytenzahl fast schon wieder erreicht ist. Entscheidender ist jedoch, daß die eigentliche Abwehrfunktion der Lymphozyten, nämlich auf einen Antigenstimulus zu reagieren, stark beeinträchtigt ist. (17)

Die Proliferationsfähigkeit wurde durch die Bestrahlung somit in viel stärkerem Maße geschädigt als die Lymphopoese selbst. Die Patienten unterliegen somit einer Schädigung der Lymphozytentransformierbarkeit zu einer Zeit, in der sie ihre immunologische Widerstandsfähigkeit gegen Metastasen dringend benötigen. Zu dem ist die Anfälligkeit gegenüber Infekten wesentlich erhöht.

B FRAGESTELLUNG

Ziel dieser Arbeit war es, Novocain und einen Vitamin-Komplex im Hinblick darauf zu testen, die immunsuppressive Wirkung der Radiotherapie abzuschwächen z.B. in einer pharmakologischen Beeinflussung des Restitutionsprozesses, vielleicht über eine intrazelluläre Erholung (recovery) und DNA-Reparation (repair).

Eine Methode zur Untersuchung der Funktionstüchtigkeit bestrahlter Lymphozyten ist das Ausmaß der Stimulierung zu messen, und zwar mit dem unspezifischen wirkenden Antigenstimulus Phytämagglutinin (PHA). Es tritt dabei eine Transformation des sonst kleinen "ruhenden" Lymphozyten zu einem großen pyrinophilen Immunoblasten ein. Dabei durchläuft die proliferierende Zelle die Phasen des Zellzyklus. Die G_1 -Phase (einfacher Chromosomensatz) bereitet die nachfolgende S-Phase (Synthesephase der DNA-Verdoppelung) vor.

Nach der S-Phase folgt die G_2 -Phase (doppelter Chromosomensatz), in der die Mitose vorbereitet wird. Als Meßgröße für die Wirkung ionisierender Strahlen auf die Funktionstüchtigkeit des Lymphozyten dient seine Stimulierbarkeit durch PHA, wobei

von der herkömmlichen autoradiographischen Methode abgegangen wurde. Ich benutzte die von Dittrich und Göhde (1969) neu entwickelte Methode der Impulszytrophotometrie (ICP), bei der der DNA-Gehalt einer ganzen Zellpopulation in kurzer Zeit gemessen werden kann. (34)

C WIRKUNG von PHA

Nach Zugabe von PHA in das Nährmedium einer Lymphozytenkultur kommt es sehr rasch zu einer Interaktion zwischen PHA und einem Rezeptor an der Oberfläche des Lymphozyten. (6)

Die Anwesenheit von PHA an der Zelloberfläche löst nun durch ein induktives Einwirken intrazelluläre Vorbereitungen aus, die zu einer Mitose führen.

1 Std. nach PHA-Zusatz ist schon eine Steigerung der RNA-Synthese nachweisbar (7), die autoradiographisch beurteilt werden kann.

4 Std. nach PHA-Zusatz setzt dann die Proteinsynthese ein. (8) Es werden Enzyme und DNA-Bausteine synthetisiert für die sich anschließende DNA-Synthese (S-Phase).

Nach 36 Std. beginnen die Lymphozyten in der Kultur DNA zu bilden. Der ^3H -Thymidin Markierungsindex steigt dann S-förmig an (9), und die Zellen zeigen eine ziemlich lebhafte, in Schüben ablaufende mitotische Aktivität. Die Kerne der Zellen vergrößern sich und zeigen eine "retikuläre" Struktur mit deutlichen Nucleolen in den meisten Zellen. Die Basophilie des Zytoplasmas wird ausgeprägt. Elektronenoptisch (10) erkennt man bei der trans-

formierten Elastenzelle im Vergleich zu dem kleineren Lymphozyten eine größere Anzahl von Mitochondrien, reichlich zytoplasmatische Ribosomen sowie einen hochentwickelten Golgiapparat. Den in größerer Zahl entwickelten Ribosomen entspricht die Proteinsynthese dieser Zellen.

D BESPRECHUNG DER LITERATUR

Lymphozyten verschiedener Größenordnungen werden durch Bestrahlung in ungleicher Weise getroffen. Die kleinen Zellen sind strahlenempfindlicher als die mittelgroßen und diese wiederum sensibler als die großen Zellen. (11)

Vor allem die kleinen Lymphozyten sind äußerst strahlensensitiv. Es zeigen sich schon nach in vitro Bestrahlung von 50 rd einer Suspension von Milz- oder Thymuslymphozyten sehr schnell Kernpyknoten. Nach einer Ganzkörperbestrahlung bei Säugetieren mit 150 rd sind ungefähr 50 % der kleinen Lymphozyten in den Lymphknoten zerstört. Dieser Anteil nimmt mit steigender Dosis schnell zu. (12)

Interessant ist der Nachweis, daß stimulierte Zellen weniger strahlenempfindlich sind als die kleinen Lymphozyten, von denen sie abstammen. Diese Abnahme der Empfindlichkeit ist sowohl für die in Plasmazellen (16) als auch für die in Lymphoblasten (15) transformierten Lymphozyten, sowie für die mit PHA stimulierten Lymphozyten (18) erbracht worden. Brannon und Dewey (1969) fanden heraus, daß die transformierte Zelle mit einer D_0 von 250 rd bedeutend strahlenresistenter ist als

der sehr empfindliche kleine Lymphozyt mit einer $D_{0.01}$ von 20 rd, wobei sich eine Korrelation zwischen der erfolgten Proteinsynthese und der Strahlenresistenz zeigte.

Durch das Einwirken von Strahlen tritt eine Inaktivierung von Eiweißen, vor allem von Enzymen, ein. Sie beruht auf Störungen der Sekundär- und Tertiärstruktur. Im Milieu der Zelle ist jedoch erst bei sehr hohen Dosen eine Minderung der Enzymaktivitäten nachweisbar, wobei eine unterschiedliche Sensitivität der Enzymsysteme zu beobachten ist. Die Protein Biosynthese ist wesentlich strahlenresistenter als die DNA-Synthese. Auch die Antikörpersynthese wird bei relativ kleineren Dosen nicht primär durch die Eingriffe in die Synthese selbst, sondern durch den Untergang immunkompetenter Zellen herabgesetzt. (19)

Bei Bestrahlung von Lymphozyten kommt es auch zu einer Schädigung der DNA, die im wesentlichen in einem Bruch des Nucleotidstrangs sowie einer Schädigung der Basenstruktur liegt. Ein Bruch der Nucleotidkette führt zum Abbruch der Informationsabgabe und somit zu einer vollständigen Proteinsynthese. Eine Veränderung der Basenstruktur bewirkt dagegen eine Veränderung der Information der DNA, die zu einer Veränderung der Aminosäurezu-

sammensetzung des entsprechenden Proteins führen kann. Die Zelle kann jedoch durch verschiedene enzymgesteuerte Prozesse molekulare Schäden der DNA reparieren. Dabei unterscheidet man eine Reaktivierung durch Bestrahlung mit sichtbarem Licht (Photoaktivierung) von dem Dunkel-repair, bei dem unter Beteiligung zahlreicher Enzyme, die defekte Stelle des DNA-Stranges herausgeschnitten und durch den Einbau von Nukleotiden ersetzt wird. (20)

Nach Einwirkung ionisierender Strahlung kann man nach H.Kaufmann (1971) von zwei Haupttypen einer Störung der Mitoseaktivitäten sprechen. (14)

- 1) Die irreversible Unterbrechung der Mitose
(Reproductiv death)
- 2) Die reversible Verzögerung der Mitose
(mitotic delay)

Zur irreversiblen Mitosehemmung kommt es nach der Theorie von Rustad (22) dadurch, daß die Bildung oder Teilung der Zentriolen gestört ist, wobei es auf eine Blockierung der SH-Gruppen zurückführt. (22)

Die reversible Störung der Mitose zeigt sich an der charakteristischen Veränderung der Mitoserate. Kurz

nach Bestrahlung sinkt die Mitoserate schnell und dosisabhängig ab, es folgt ein mitosefreies Intervall, dessen Länge mit steigender Dosis zunimmt, dann steigt die Mitoserate wieder an und überschreitet für einige Zeit sogar den Ausgangswert.

(14)

Strahlen beeinträchtigen auch die Stimulation des Lymphozyten. Bestrahlt man Lymphozytenkulturen mit steigenden Dosen 250 - 2000 rd mit einer 60 Co Strahlung und setzt sie einer 72 Stunden dauernden PHA Stimulierung aus, so findet man eine deutliche strahleninduzierte Unterdrückung des ^3H -Thymidineinbaus. Dies bedeutet eine klare Unterdrückung der S-Phase. Der Eintritt in die S-Phase ist verzögert, während die S-Phase selbst ihre normale Dauer von 10 Stunden beibehält.

Die G_2 -Phase zeigt eine dosisabhängige Verlängerung.

(13)

Eine klinische Arbeit von Madl und Kärcher (1973) befaßt sich mit dem Verhalten PHA stimulierter Lymphozyten vor, während und nach Bestrahlung mammarkarzinomoperierter Patienten. Die Patienten erhielten eine Gesamtdosis von 4000 - 5000 rd. Spätestens 3 Wochen nach Bestrahlungsbeginn kam es zu einer hochsignifikanten Abnahme des Tritiumthymidineinbaus, die während der Dauer der Bestrahlung anhielt.

Bei 10 Patienten zeigte sich 6 Monate p.r. ein Anstieg des Einbaus bis zu 50 % des Ausgangswertes, jedoch wurde der Ausgangswert in keinem einzigen Fall erreicht (17), was eine Störung der Lymphozytenfunktion bedeutet.

Die Suche nach strahlenschützenden und restitutiven Substanzen gewinnt besondere Bedeutung in Anbetracht der elementaren Strahlenschäden für den Zellorganismus, bewirkt durch die Wechselwirkung ionisierender Strahlen mit Materie.

WIRKUNGSMECHANISMEN STRAHLENSCHÜTZENDER SUBSTANZEN

Aus zahlreichen Mitteilungen des Schrifttums sind eine Vielzahl von strahlenschützenden und restitutiven Substanzen bekannt (29), deren Dosisreduktionsfaktor jedoch selten den Wert 2 überschreitet. Über den Wirkungsmechanismus strahlenresistenz erhöhender Stoffe bestehen verschiedene Theorien.

Nach einer Hypothese von Eldjarn und Phil (20) besteht die Resistenzsteigerung in der Bildung gemischter Disulfide bei der prophylaktischen Gabe eines Thiol-Körpers von der Art des Cysteins-Cysteamins. Bacq und Goutier (21) entwickelten die Hypothese vom "Biochemischen Schock" als Ursache der durch einen chemischen Körper hervorgerufenen Resistenzsteigerung.

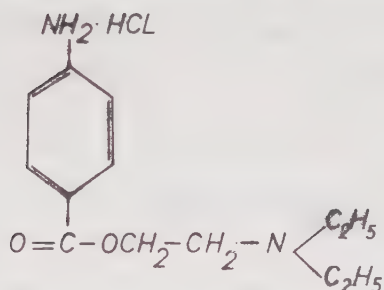
H. u. M. Langendorff (23) nehmen an, daß eine Reihe von Hormonen und biogenen Aminen, wie auch verschiedene andere chemische Körper z.B. Aminoäthylisothiuronium (AET), Fluoracetat, gewisse Endotoxine u.a. über den von Sutherland (24) entdeckten Adenylcyclase-cycl. AMP Mechanismus wirken. Dem cycl. AMP in der Effectorzelle fällt dabei die Rolle eines Regulators zu, durch den einmal Enzymaktivierungen und Inaktivierungen hervorgerufen werden; zum andern die Synthese von Enzymen induziert und gesteuert wird.

Die Wirkung anderer Schutzsubstanzen (27) wie z.B. Hydroxybuttersäure, dem Nitrit der Bernsteinsäure u.a. beruht darauf, daß durch Abfangen der freien Radikale die indirekte Strahlenwirkung herabgesetzt wird. Interessant ist auch, daß durch Schutzsubstanzen wie AET, Histamin, Natriumfluoracetat, Serotonin es zu einer Gewebshypoxie kommt, die durch eine Hemmung des Sauerstoffverbrauchs verursacht wird. (28) Die biologische Wirkung der Strahlen ist damit herabgesetzt, da die Entstehung von freien Radikalen vermindert ist. Die Effektivität vieler Substanzen ist jedoch in der Regel eingeschränkt durch die toxische Wirkung der angewandten Dosen. Auch ist die Wirkungszeit besonders der effektivsten Thiol enthaltenden Mittel recht kurz. (29)

In dieser Arbeit wird Novocain und ein Vitamin-komplex als Strahlenschutzsubstanz untersucht und zwar speziell im Hinblick auf die Funktion des Lymphozyten, die nach einer Bestrahlung stark eingeschränkt ist.

NOVOCAIN

(p-Aminobenzoyl-diaethylaminoethanol-hydrochlorid)



Während das 1905 von Eichhorn entdeckte Novocain bereits ein Jahr später als Lokalanästhetikum eingeführt wurde, fand diese Substanz erst 1955 (30) durch A.Aslan in Verbindung mit einer Vitamin-komponente zur günstigen Beeinflussung verschiedener Altersvorgänge Verwendung. Aslan führt diesen Einfluß (31) auf das Einwirken in die subcortikalen Kerne, das Mark und die peripheren Nerven zurück,

wobei eine Verbesserung der biokatalytischen Prozesse in der Nervenzelle selbst eine Rolle spielen.

Auch auf das vegetative Nervensystem wirkt Novocain. Dabei kommt es sowohl zu einer Beeinflussung des Vagus, als auch des Sympathikus.

Novocain wird durch Esterasen in Diäthylamino-äthanol und Paraaminobenzoesäure gespalten, welche im Intestinaltrakt durch Bakterieneinwirkung wiederum in Folsäure umgewandelt wird, weshalb Aslan Novocain zur Betonung des Vitamincharakters der Esterbindung in Anlehnung an eine ältere Nomenklatur "H3" nennt.

VITAMINKOMPLEX

Zusammensetzung:

Nikotinsäureamid	20.00 mg
Vit. B ₁ (Thiamin-HCL)	5.15 mg
Vit. B ₂ (Riboflavin-5-phosphat-Natrium	2.05 mg
Vit. B ₆ (Pyridoxin-HCL)	2.50 mg
p-Aminobenzoesäure	20.00 mg
Natrium-D-pantothat	3.00 mg
Inosit	10.00 mg

Nikotinsäureamid ist Bestandteil der Koenzyme Nikotinamidadenindinukleotid (NAD^+ = Codehydrase 1) und Nikotinamidadenindinukleotidphosphat (NADPH = Codehydrase 2). Es ist in allen Geweben des Organismus vorhanden. Die beiden Koenzyme NAD^+ und NADPH sind prosthetische Gruppen der Dehydrogenasen und somit Überträger von Wasserstoff, vor allem auf die Flavoenzyme, die bei der biologischen Oxidation in der Atmungskette eine bedeutende Rolle spielen.

Die Wirkform des Vitamin B_1 im Organismus stellt das Thiaminpyrophosphat (TPP) dar. Als TPP ist das Vitamin das Koenzym einer Reihe von Enzymen wie z.B. der Pyruvatoxidase und Transketolase, die im Kohlehydratstoffwechsel Schlüsselstellungen einnehmen. Thiamin zeigt im Tierexperiment eine Reihe pharmakologischer Effekte, jedoch nur nach Verabreichung sehr hoher Dosen. So bewirken i.v. Gaben einen transitären Abfall des Blutdrucks bei Katzen und Hunden, der mit zunehmender Dosis jedoch wieder ansteigt. Auch eine ganglienblockierende Wirkung und Unterdrückung der neuralen Reizübertragung auf den Skelettmuskel ist erwiesen. Ebenfalls wird berichtet, daß bei Stimulierung cholinergischer Nerven Thiamin neben Acetylcholin freigesetzt wird.

Vitamin B₂ (Riboflavin) ist Bestandteil der prosthetischen Gruppe der Flavoenzyme. Somit ist es an zahlreichen Schlüsselreaktionen im Intermediärstoffwechsel maßgeblich beteiligt. Die Flavoenzyme greifen in fast alle Stoffwechselbereiche ein, insbesondere sind sie mit dem Metabolismus der Aminosäuren und Proteine verknüpft. Zu den wesentlichen Reaktionen gehört die Wasserstoffübertragung von Pyrimidinnukleotiden, wie NAD⁺ und NADPH auf Cytochrom C.

Vitamin B₆ (Pyridoxin) nimmt als Koenzym einer Vielzahl von Enzymen in seiner phosphorylierten Form eine zentrale Stellung im Proteinmetabolismus ein. Im Gehirnstoffwechsel ist es maßgeblich an der Bereitstellung der für die synaptischen Übertragungen notwendigen Amine wie auch der Transmittersubstanz - - Aminobuttersäure beteiligt. (32)

Paraaminobenzoesäure (PAB) ist essentieller Bestandteil der Koenzyme, die für die Übertragung der C₁-Bruchstücke des Zellstoffwechsels wichtig sind. PAB ist auch ein wichtiger Bestandteil, der zur Folsäuresynthese notwendig ist.

Die Pantothersäure übt ihre Funktion im tierischen Organismus als Wirkgruppe des Koenzym A aus, dessen wesentliche Aufgabe in der Übertragung von Carbon-

säuren besteht. Das Koenzym A nimmt im Citratzyklus eine Schlüsselstellung ein. So bindet es den bei der oxydativen Decarboxylierung des Pyruvats entstehenden Acetylrest und überträgt ihn auf Oxalacetat unter Bildung von Citrat.

Inosit ist ein zyklisch sechswertiger Alkohol, der als Alkoholkomponente in Inositphosphatiden vorkommt. Diese findet man in fast allen Zellen, wo sie Bestandteil der Zellmembranen bilden. Das Nervengewebe ist besonders reich an Inositphosphatiden. (33)

E SPEZIELLE FRAGESTELLUNG

Gegenwärtige immunologische Untersuchungen haben einerseits den Einfluß des Alterns auf die immunitäre Reaktion des Individuums und andererseits die eventuelle Rolle der immunologischen Mechanismen im Alterungsprozeß hervorgehoben. (22)

David und Enachescu untersuchten 1968 die therapeutische Stimulierungsfähigkeit der immunologischen Reaktivität mittels einer biotrophischen Behandlung mit Novocain und dem Vitaminkomplex. Dabei fanden sie eine signifikante Erhöhung verschiedener Antikörpertiter. (22)

Im Hinblick auf eine Wirkung auf das Immunsystem und die Vergleichbarkeit einiger Alterserscheinungen mit denen nach Bestrahlung (26) wird in dieser Arbeit untersucht, ob Novocain und die Multivitamin Komponente einen Einfluß auf die Lymphozytenstimulierbarkeit haben, die nach Untersuchungen von Madl und Kärcher (1973) noch über einen Zeitraum von 6 Monaten p.r. hinaus stark beeinträchtigt ist. (17)

F METHODIK

Es wurden insgesamt 90 jugendliche, weiße weibliche "Sprague-Dowley" Ratten von 200 - 250 g verwendet. Alle Tiere erhielten eine einmalige Ganzkörperbestrahlung von 100 rd. Die Tiere wurden in drei Gruppen aufgeteilt:

- 1) 30 Kontrolltiere, die nur die Bestrahlung erhielten und physiol. NaCl-Lösung über 14 Tage gespritzt bekamen.
- 2) 30 Tiere, die zusätzlich 30 Minuten vor der Bestrahlung und danach täglich über 14 Tage eine s.c. Injektion von Novocain in einer Dosis von 6 mg/kg entsprechend 10 % der DL 50 von Novocain für Ratten = 60 mg/kg erhielten.
- 3) 30 Tiere, die zusätzlich 30 Minuten vor der Bestrahlung und danach täglich 14 Tage hinweg s.c. einen Multivitaminkomplex gespritzt bekamen. (Die Substanzen wurden uns freundlicherweise von der Firma Gerot, Wien zur Verfügung gestellt).

Die Tiere wurden in einer Co 60 Anlage bestrahlt, und zwar mit einer Dosisleistung von 0,749 Mrd/h, in der Zentralposition, mit Fricke ausdosimetriert.

Dies entspricht einer 100 rd Ganzkörperbestrahlung während 6 Minuten in 1 m Entfernung von der Konfiguration.

Innerhalb einer Gruppe wurden jeweils 10 Tiere 1 - 2 Stunden, 14 Tage bzw. 28 Tage nach der Bestrahlung mit Äther narkotisiert, laparatomiert und durch Eröffnen der vena cava inferior und der aorta abdominalis entblutet. Zur Vermeidung einer Koagulation wurde vorher 0,3 ml Liqemin injiziert. Das weitere Vorgehen dient der Gewinnung der Lymphozyten aus dem Blut durch Trennung der Blutzellen auf Grund ihrer unterschiedlichen spezifischen Gewichte nach der Methode von Yan de Vries et al. bzw. Wottawa, Klein und Altmann (1974), bei der verdünntes, heparinisiertes Blut mit einer Lösung aus "Ficoll" (Pharmazia Uppsala, Schweden) und "Urografin" (Schering AG., Berlin) unterschichtet und 20 Minuten bei 2000 U/m zentrifugiert wird. (25)

Da das spezifische Gewicht dieser Lösung über dem der Lymphozyten liegt, setzen sich diese als schmale weiße Bande an der Grenze von Zentrifugierung und Plasma ab, während sich die restlichen Blutzellen am Boden des Röhrchens befinden. Nach der Zentrifugation wurden die Lymphozyten mit einer Pipette abgehoben, zwei- bis dreimal in

physiologischer NaCl-Lösung gewaschen und anschließend in zwei gleiche Hälften aufgeteilt. Die eine Hälfte wurde in 96 %igem Äthylalkohol fixiert, die andere in 10 ml Parkermedium (mit Antibiotika- und 15 % Kälberserum-Zusatz) 199 suspendiert. In diese Probe wurde 0,2 ml PHA gegeben, wodurch die Stimulierung eingeleitet wurde, die 72 Stunden bei 37° C erfolgte. Danach wurden auch diese Zellen in Alkohol fixiert.

Anschließend begann die Vorbereitung der Messung der DNA-Menge in den einzelnen Lymphozyten mit Hilfe der Impulscytophotometrie. Dazu ist die Fluorchromierung der Zellen mit Ethidiumbromid (2,7 Diamino-10-äthyl-9-phenyl-phenaritrudinumbromid) notwendig. Dieser Farbstoff bindet sich selektiv an zweisträngige Nukleinsäuren, welche die Form einer Doppelhelix im Sinne des Watson-Crick-Modells aufweisen, wobei sich seine Fluoreszenzeigenschaften erheblich verbessern. In sehr guter Näherung ergibt sich eine Proportionalität zwischen DNA-Gehalt, entsprechend der Ploidiestufe und der Fluoreszenzintensität. (34)

Um jede extranucleäre Komponente der Fluoreszenz auszuschalten, wurde das Zellplasma durch schonende Proteolyse mit Pepsin (0,5 g Pepsin 1000 E/g in

100 ml 0,2 % HCL) verdaut, wonach nur noch die Zellkerne in der Suspension verbleiben. Erst nach dieser Vorbehandlung wurden die Zellkerne fluorchromiert. (5 mg/1000 ml Tris-Puffer pH 7,5)

1. ERKLÄRUNG DES VERFAHRENS DER IMPULSCYTOPHOTOMETRIE

(Dittrich und Göhde, seit 1969)

Das Maß der Proliferationsaktivität von Zellen ist der Anteil von Zellen mit erhöhtem DNA-Gehalt.

(Zellen mit diploidem Chromosomensatz in der Ruhephase werden "G₁-Phase-Zellen" genannt; Zellen im Stadium der DNA-Synthese mit Verdoppelung der DNA-Menge sind "S-Phase-Zellen", worauf sich die "G₂-Phase-Zellen" mit diploidem Chromosomensatz vor der Mitose anschließen).

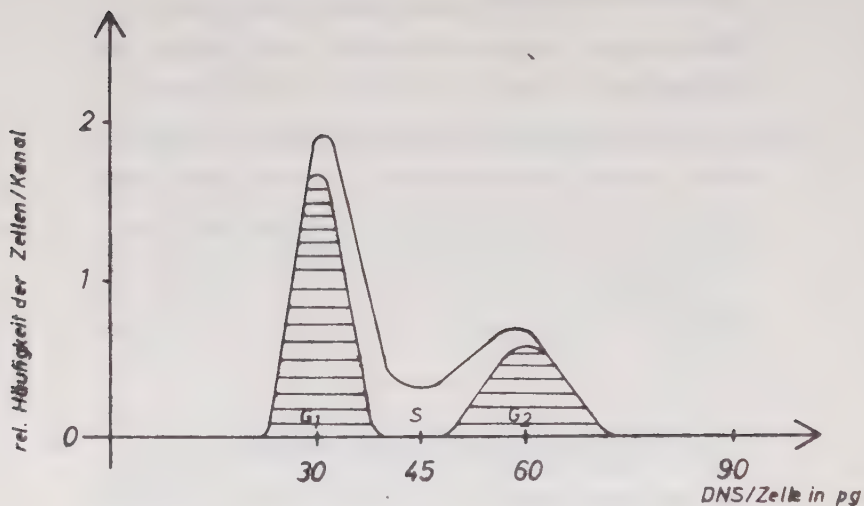
Die Impulscytophotometrie automatisiert den Transport der fluorchromierten und suspendierten Zellen durch den Tiefenschärfenbereich eines Mikroskop-Photometers, indem die Suspension angesaugt und durch die Austrittsöffnung einer engen Röhre geführt wird. Diese Öffnung stellt das Meßfeld dar, welches die Zellen nacheinander parallel zur optischen Achse mit 3m/sec durchlaufen. Jede Zelle sendet nach Anregung des Farbstoffes ein Fluoreszenzlichtsignal aus, welches in seiner Amplitude

der DNA-Menge der Zelle proportional ist. Die von einem Photomultiplier empfangenen Lichtsignale werden von einem Vielkanalanalysator einer von 128 Größenklassen zugeordnet, und gleichzeitig wird die Häufigkeit der Signale pro Größenklasse = Kanal gespeichert. So entstehen am Ende der Gesamtmessung im Speicher 128 Einzelwerte, welche die Signalzahl in jedem Kanal angeben, und die anschließend als Koordinaten eines Histogramms, also einer DNA-Mengenverteilung, ausgeschrieben werden.

2. AUSWERTUNGSMETHODIK DER HISTOGRAMME

Von den Lymphozyten jedes Tieres wurden also zwei Histogramme erstellt, entsprechend der unterschiedlichen Behandlung. Eines, welches nur die Wirkung der Bestrahlung nach 0, 14 und 28 Tagen zeigt, und eins das den zusätzlichen Stimulierungseffekt derselben Lymphozyten-Population durch PHA wiedergibt.

Bei der Auswertung eines Kurvenpaares wurde von der "unstimulierten" Kurve ausgegangen:



Zuerst wurde der Kanal des meist deutlich sichtbaren G₁-Maximum bestimmt (z.B. 30). Davon ausgehend ist die doppelte Kanalzahl = G₂-Maximum (z.B. 60) und genau zwischen diesen beiden das S-Maximum (z.B. 45). So ergaben sich drei Kanäle, die als Mitte der jeweiligen Phase des Zellzyklus anzusehen sind. Jeder dieser drei Kanäle wurde zu einer Bande erweitert, die den Bereich von 10 Kanälen umfaßt, indem, ausgehend vom Maximumkanal, die jeweils 5

höheren und niederen Kanäle bestimmt wurden (z.B. G_1 -Phase 25 - 35, S-Phase 40 - 50, G_2 -Phase 55 - 65). Dieser Bereich unter der Kurve wurde als charakteristisch für die Phase angesehen.

Unter dem jeweiligen Kurvenabschnitt wurde die Fläche planimetrisch bestimmt. Da die Amplitude der verschiedenen Histogramme von der gemessenen Zellzahl abhängt, bot sich die Auswertung an, durch Vergleich der prozentualen Anteile der Einzelphasen am Zellzyklus.

Die Flächen unter den drei Kurvenabschnitten wurden gleich 100 % gesetzt und die prozentualen Anteile der G_1 -, S- und G_2 -Phase berechnet. Die Entscheidung beim Vergleich der Anteile wurde mit Hilfe folgendem statistischen Testverfahren getroffen: U-Test von WILCOXON, MANN, WHITNEY.(29)

Der Test wurde durchgeführt an der 2. Med. Universitätsklinik München auf einer Siemens Rechenanlage 404/3 mit 64 k - Byte Kernspeicher. Der Ausdruck erfolgte auf Schnelldrucker. Die statistische Betreuung hatte cand. med et math. R.Herndel.

G ERGEBNISSE

Die Ergebnisse der unstimulierten Zellen wurden mit " - " gekennzeichnet, und die der PHA-stimulierten mit " + " .

Die Differenz der prozentualen Anteile der Phasen von " - " und " + " wurden rechts neben den Ergebnissen aufgezeichnet. Sie stellen das Maß der Stimulierbarkeit dar.

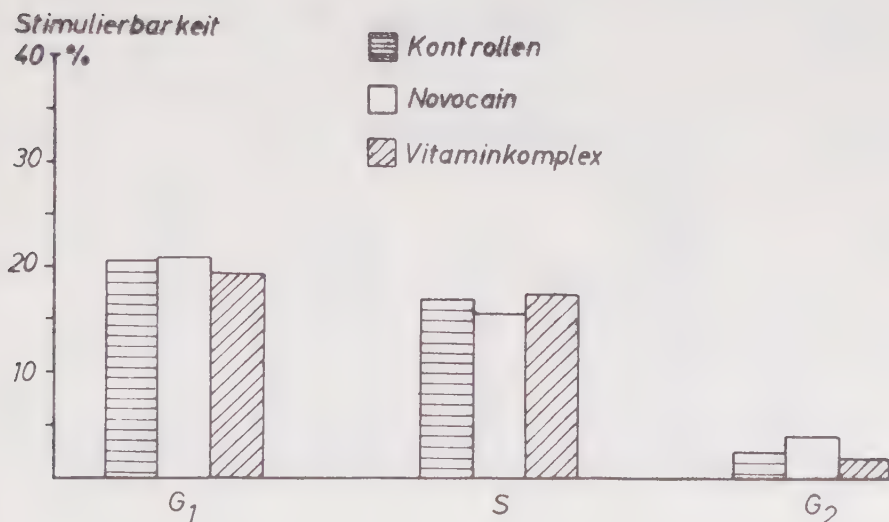
Unter den Differenzen von Novocain und dem Vitamin-Komplex steht der prozentuale Vergleich der Differenzen zu den Kontrollwerten, aus dem bei Signifikanz eine Wirkung der Substanzen hervorgeht.

1 - 2 Stunden

Kontrollen				Differenzen "-" gegen "+"		
	G ₁ %	S %	G ₂ %	G ₁ %	S %	G ₂ %
-	94,1	3,7	3,2			
+	74	21,2	4,8	20,1	17,5	2,6

Novocain			Differenzen. "-" gegen "+"			
	G ₁ %	S %	G ₂ %	G ₁ %	S %	G ₂ %
-	95,8	2,8	1,4	20	15,9	4,1
+	75,8	18,7	5,5	+ 0,1	- 1,6	+ 1,5

Vitaminkomplex			Differenzen "-" gegen "+"			
	G ₁ %	S %	G ₂ %	G ₁ %	S %	G ₂ %
-	94,8	3	3,2	19,4	17,5	1,9
+	75,4	20,5	4,1	- 0,7	+ 0	- 0,7



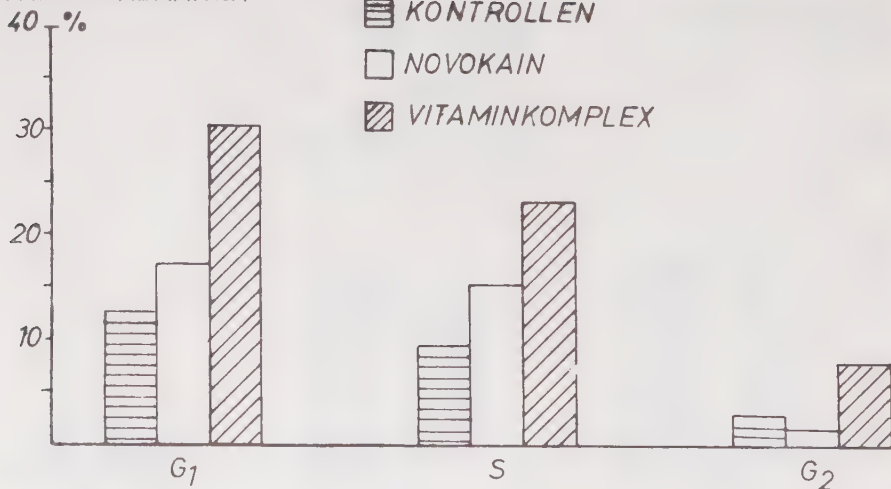
14 Tage

Kontrollen			Differenzen "-" gegen "+"		
G ₁ %	S %	G ₂ %	G ₁ %	S %	G ₂ %
- 93,3	4,3	2,4	12,6	9,4	3,2
+ 80,7	13,7	5,6			

Novocain			Differenzen "-" gegen "+"		
G ₁ %	S %	G ₂ %	G ₁ %	S %	G ₂ %
- 90,4	6,2	3,4	17,2	15,3	1,9
+ 73,2	21,5	5,3	+ 4,6	+ 5,9	- 1,3

Vitaminskomplex			Differenzen "-" gegen "+"		
G ₁ %	S %	G ₂ %	G ₁ %	S %	G ₂ %
- 91,8	4,2	4	31,5	23,3	8,2
+ 60,3	27,5	12,2	+ 18,9	+ 13,9	+ 5

STIMULIERBARKEIT



Prozentualer Vergleich der Differenzen: 14 Tage

28 Tage

Kontrollen			Differenzen "-" gegen "+"		
G ₁ %	S %	G ₂ %	G ₁ %	S %	G ₂ %
- 91,2	4,3	4,5			
+ 62,9	25,1	12	28,3	20,8	7,5

Novocain			Differenzen "-" gegen "+"		
G ₁ %	S %	G ₂ %	G ₁ %	S %	G ₂ %
- 95,6	3,5	0,9			
+ 71,5	22,7	5,8	24,1	19,2	4,9
			- 4,2	- 1,6	- 2,6

Vitaminkomplex			Differenzen "-" gegen "+"		
G ₁ %	S %	G ₂ %	G ₁ %	S %	G ₂ %
- 90,7	4,1	5,2			
+ 72,4	21,6	6	18,3	17,5	0,8
			- 10	- 3,3	- 6,7

Stimulierbarkeit

40 %

30

10

▨ Kontrollen

□ Novocain

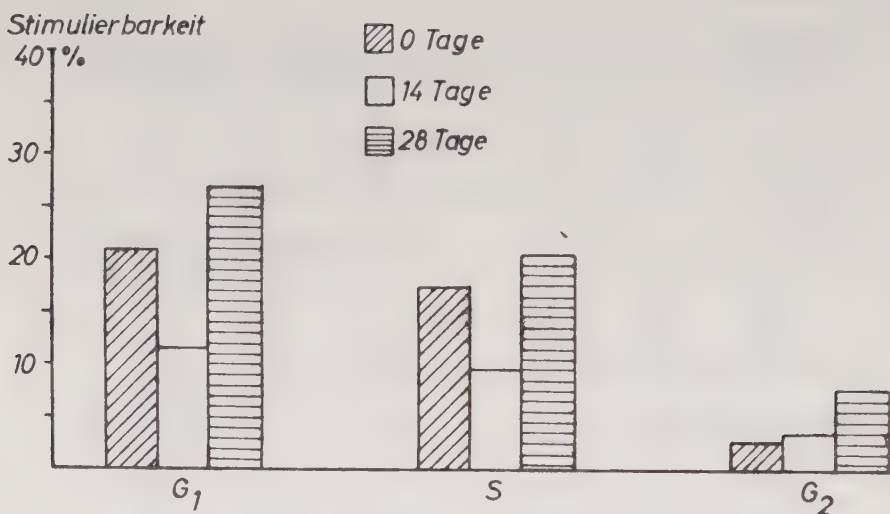
▩ Vitaminkomplex

G₁

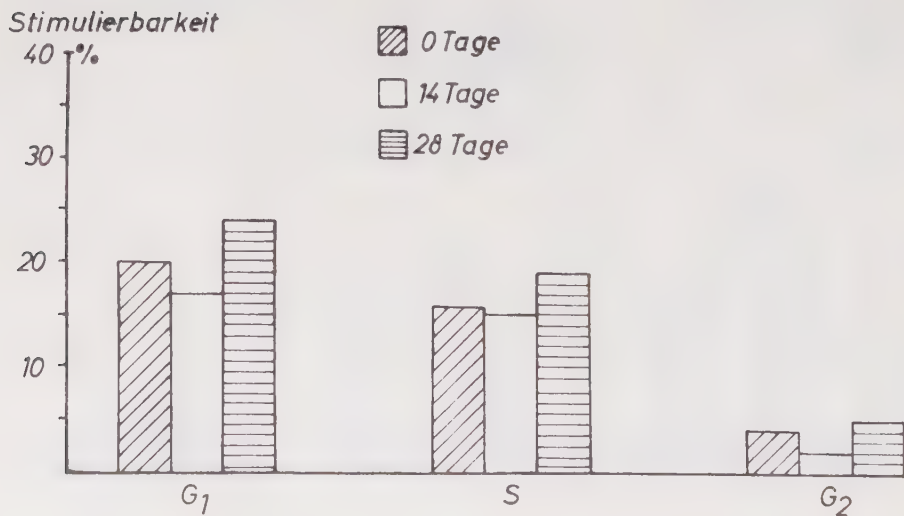
S

G₂

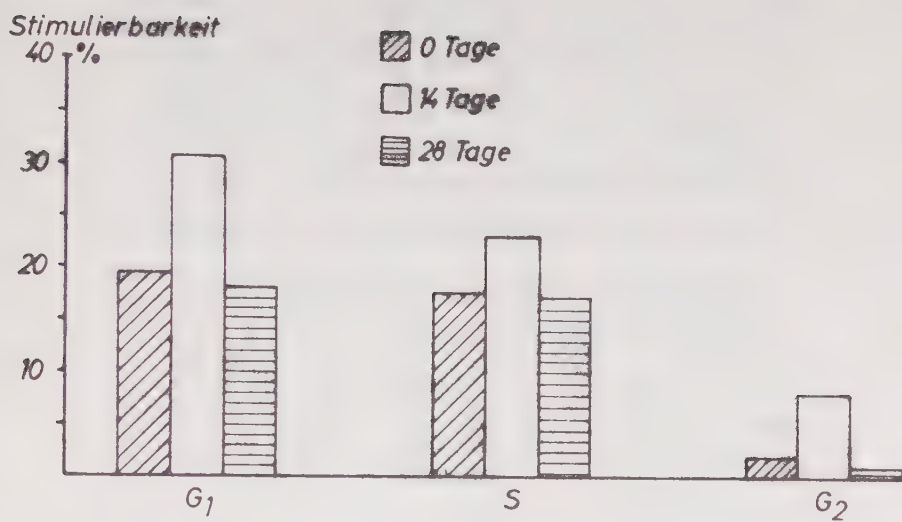
Prozentualer Vergleich der Differenzen: 28 Tage



Verlauf der Kontrollen über 0, 14, 28 Tage



Verlauf von Novocain über 0, 14, 28 Tage



Verlauf des Vitamin-Komplexes über 0, 14, 28 Tage

H DISKUSSION

Es sollte in dieser Arbeit geklärt werden, ob Novocain und ein Vitaminkomplex die Stimulationsfähigkeit bestrahlter Lymphozyten durch Phythämagglutinin (PHA) entscheidend beeinflußt.

Vergleicht man die Stimulierbarkeit der Kontrollen mit der von Novocain und dem Vitaminkomplex nach 1 - 2 Stunden, so sieht man keine entscheidende Beeinflussung. Sowohl die Kontrollen als auch beide Substanzen zeigen einen S-Phasenzuwachs von 16 % - 17 % und einen G₂-Phasenzuwachs von 2 % - 4 %.

Nach 14 Tagen erkennt man bei den Kontrollen ein Absinken der Stimulierbarkeit von 17,5 % auf 9,4 % in der S-Phase. Die Stimulierbarkeit ist somit gegenüber dem Kontrollwert von 0 Tagen um 8,1 % abgesunken ($p = 0,01$). Dies könnte man folgendermaßen erklären:

PHA moleküle binden sich zur Induktion der DNA-Synthese an bestimmte Plätze der Zelloberfläche des Lymphozyten. Man weiß nun, daß einige Zeit nach einer Bestrahlung - Globuline synthetisiert werden, die diese Plätze an der Zelloberfläche besetzen und somit die Rezeptoren für PHA (35) (36) blockieren. PHA kann deshalb nur an einem geringeren Teil der Lymphotyten angreifen.

Man kann vielleicht von einer kompetitiven Hemmung der PHA Moleküle durch konkurrierende - Globuline sprechen. Vergleicht man nun die Stimulierbarkeit der Kontrollen, S-Phase = 9,4 % und G_2 -Phase 3,2 %, nach 14 Tagen mit der von Novocain und dem Vitaminkomplex, so sieht man bei den mit Novocain behandelten Zellen eine Stimulierbarkeit, die sich in einem Anstieg der S-Phase von 15,3 % ausdrückt. Dies bedeutet einen signifikanten Zuwachs der Stimulierbarkeit von 5,9 % mit einem Signifikanzniveau von $p = 0,025$.

In der Gruppe von Tieren, die über 14 Tage hindurch den Vitaminkomplex gespritzt bekamen, erkennt man einen Anstieg in der S-Phase von 23,3 % und der G_2 -Phase von 8,2 %.

Beim Vergleich zu den Kontrollen erkennt man ein starkes Anwachsen der S-Phase um 13,9 % und der G_2 -Phase um 5,0 %. Dies bedeutet eine signifikante Verbesserung der Stimulierbarkeit der Lymphozyten mit einem Signifikanzniveau von $p = 0,01$.

Man kann annehmen, daß durch Novocain, vor allem aber durch den Vitaminkomplex, es zu einer Erholung im Sinne eines recovery-Prozesses gekommen ist. Dabei können Schäden, die im Informationssystem zwischen der Oberflächenbindung des PHA und der DNA-Synthese

liegen könnten, besser beeinflußt werden, d.h. es werden bessere Kommunikationsmöglichkeiten geschaffen.

Novocain und der Vitaminkomplex könnten auch eine stimulierende Wirkung auf die Lymphozyten besitzen, die noch zusätzlich zur Wirkung von PHA käme, was jedoch durch Vergleich mit unbestrahlten Lymphozyten zu beweisen wäre.

Nach 28 Tagen zeigt sich bei den Kontrollen ein Anwachsen in der S-Phase von 4,3 % auf 25,1 %, was eine Stimulierbarkeit von 20,8 % bedeutet.

Man kann sagen, daß sich die Stimulationsfähigkeit der Lymphozyten durch Restitution des Stimulationsystems wieder erholt hat. Novocain und der Vitaminkomplex zeigen in der S-Phase einen Anstieg auf 19,2 % und 17,5 %. Dies bedeutet somit eine Normalisierung zu der ursprünglich vorhandenen Stimulationsfähigkeit.

I ZUSAMMENFASSUNG

Ziel dieser Arbeit war es, Novocain und einen Vitaminkomplex im Hinblick darauf zu testen, die immunsuppressive Wirkung der Radiotherapie, die durch nachhaltige Schädigung der Lymphozytenfunktion eintritt, abzuschwächen.

Insgesamt wurde die Lymphozytenfunktion von 90 Ratten, die alle eine Ganzkörperbestrahlung von 100 rd erhielten, nach 1 - 2 Stunden, 14 und 28 Tagen im Vergleich von behandelten zu unbehandelten Tieren ausgewertet.

Um die Funktionstüchtigkeit der Lymphozyten zu messen, wurde das Ausmaß der Stimulierung durch den unspezifisch wirkenden Antigenstimulus Phythämagglutinin (PHA) mit Hilfe der Impulszytrophotometrie (ICP) bestimmt, bei der der DNA-Gehalt einer ganzen Zellpopulation gemessen wird. Anhand planimetrisch ausgewerteter Histogramme wurden die Anteile der Einzelphasen des prämitotischen Zellzyklus G_1 -Phase (einfacher Chromosomensatz), S-Phase (DNA-Synthesephase), G_2 -Phase (doppelter Chromosomensatz) prozentual berechnet, statistisch ausgewertet nach dem U-Test von Wilcoxon, Mann, Whitney und danach miteinander verglichen.

Dabei zeigte sich, daß nach 14 Tagen die Stimulierbarkeit der mit Novocain behandelten Zellen im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen um 5,9 % in der S-Phase anstieg ($p = 0,025$).

Bei den mit Vitaminkomplex behandelten Zellen verbesserte sich die Stimulierbarkeit sogar um 13,9 % in der S-Phase gegenüber den Kontrollen ($p = 0,01$).

Man kann annehmen, daß durch Novocain, vor allem aber durch den Vitaminkomplex, es zu einer Erholung im Sinne eines recovery-Prozesses gekommen ist. Dabei können Schäden, die im Informationssystem zwischen der Oberflächenbindung des PHA und der DNA-Synthese liegen könnten, besser beeinflußt werden, d.h. es werden bessere Kommunikationsmöglichkeiten geschaffen.

J LITERATURVERZEICHNIS

- | | |
|---|--|
| 1. LAW, L.W. | Cancer Res. 29, (1969) |
| 2. OLD, L.J.
BOYSE, E.A. | Med.klin.N.Amer. 50, (1971) 901 |
| 3. ZAK
DIENSTBIER | Strahlenth. 144 (1972) 60-69 |
| 4. BALDWIN, R.W.
EMBLETON, M.J.
PRICE, M.R. | Int. J.Cancer 12 (1973) 84 |
| 5. STJERNSWÄRD, J.
JONDAL, M.
VANKY, F.
WIGZELL, H.
SEALY, R. | Lancet 1 (1972) 1352 |
| 6. - | Exp. cell res. 54 (1969) 231 |
| 7. COOPER, L.H.
RUBIN, A.D. | Blood 25 (1965) 1014 |
| 8. BACH, F.H.
HIRSCHHORN | Exp. cell res. 32 (1963) 592 |
| 9. BENDER, M.A.
PRESCOTT, D.M. | Exp. cell res. 27 (1962) 221 |
| 10. TANAKA, Y.
und Mitarbeiter | Blood 22 (1963) 614 |
| 11. DE BRUYN, P.P.H.
TORNOVA-SVEHLIK, M.M.
VENTER, I.J. | Radiat. res. 24 (1965) 15 |
| 12. KOZINETS, G. | In manual on Radiation
Haematology
Vienna: IAEA 1971 |
| 13. RICKINSON, A.B.
ILBERY, P.L.T. | Cell Tissue kinet. 4 (1971)
549 - 562 |
| 14. KAUFMANN, H. | Strahlenth. 141, 4 (1971)
439 - 445 |
| 15. SCHREK, R. | Arch. Path. 85, 13 (1968) |

16. MAKINODAN, T. Journ. Cellular Physiol. 69,
NETTESHEIM, P. 355 (1968)
MORITA, T.
CHADWICK, C.

17. KÄRCHER, K.H. "Das Verhalten der PHA-
MADL, W. stimulierten Lymphozyten im
Verlauf der Nachbestrahlung
bei Mammakarzinomoperierten
Patientinnen"

18. FLIEDNER, T.M. In: "The Lymphozyt in Immunology
and Haematopoesis"
S.198 Herausg. I.M.Yoffey-
London: Arnold 1968

19. BREIT, A. In: "Biologische Grundlagen der
BÜHL, U. Strahlenwirkung"
BUNDE, E. S.23 Münchner Radiologiescriptum
u.andere

20. ELDJARN, L. "Mechanismus in Radiobiology"
PHILHL, W. Academic Press, New York 1960

21. BACQ, Z.M. "Recovery and Repair Mechanismus
GOUTIER, R. in Radiobiology"
Brookhaven Symposia on Biology 20
(1967) 241

22. DAVID, C. "Immunologische Untersuchungen
ENACHESCU, G. bei Bejahrten. Dynamische As-
pekte der Reaktivität bei anti-
genen Stimuli aus dem OAB-Blut-
gruppensystem. Therapeutische
Stimulierungsmöglichkeiten der
immunologischen Reaktivität"
Therapiewoche 7, 14-21 (1956)

23. LANGENDORFF, H.u.M. "Experimentelle Untersuchungen
zum Wirkungsmechanismus strah-
lenresistenz erhöhender Substan-
zen"
Strahlenth. 143, 4 (1972)
432 - 443

24. SUTHERLAND, E.W. Amer. med. Ass. 214 (1970) 81

25. WOTTAWA, A. "Eine Methode zur Isolierung
ALTMANN, H. menschlicher und tierischer
KLEIN, G. Lymphozyten mit Ficoll-Urografin"
Wiener klinische Wochenschrift 86
(6), 161-163 (1974)

26. ENACHESCU, G.
DAVID, C. "Das Altern und die immuno-
logischen Vorgänge"
Gernotologia (Basel) 10, 76
(1963)
27. PANEK, R. Strahlenth. 143, 5 (1972)
559 - 569
28. MISUSTOVA, J.
NOVAK, M. Strahlenth. 141, 1 (1971)
HOSEK, B. 126 - 131
29. SACHS, L. "Statistische Auswertungs-
methoden" S.230
Springer Verlag Berlin, Heidel-
berg, New York 3.Auflage 1971
30. ASLAN, A. Die Therapiewoche 8.Jahrgang
Heft 1 (1957)
31. HAMMERL, H.
PICHLER, O. Wiener Zeitschrift für innere
Medizin
Heft 4, 42.Jahrgang (1961)
180 - 196
32. KUEMERLE, H.P.
GARETT, E.R. Klin.Pharmakologie und Pharmako-
therapie S.278/282
SPITZY, K.H. Verl. Urban-Schwarzenberg (1973)
33. KARLSON, P. "Kurzes Lehrbuch der Biochemie"
S.212 - Georg Thieme Verl. (1972)
34. GÖHDE, W.
DITTRICH, W. Impulsfluormetrie - ein neu-
artiges Durchflußverfahren zur
ultraschnellen Mengenbestimmung
von Zellinhaltsstoffen
Vortrag 13.Symp. der Ges. für
Histochemie Graz 1969 A.Histo-
chem.Supplementband 10 (1971) 174
35. MAKINODAN, T.
GENGOSIAN, N. in RAD. PROTECT. and REV., ed.
A.HOLLAENDER, PERGAMON PRESS
(1960) p.324
36. Science 184 (1974) 552

An dieser Stelle sei allen gedankt, die zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. K.H. Kärcher für die freundliche Überlassung des Themas.

Für konstruktive kritische Ratschläge bei der Zusammenstellung und Abfassung dieser Arbeit möchte ich Herrn Prof. Dr. A. Fritz und Prof. Dr. K. Hochstraßer herzlich danken.

Für wertvolle Anregungen danke ich auch Herrn Dr. H. Altmann, Leiter der Instituts für Biologie, Reaktorzentrum Seibersdorf bei Wien, wo ich den experimentellen Teil der Arbeit freundlicherweise durchführen durfte.

Danken möchte ich auch Frau Ficker, Leiterin der Tierhaltung des Instituts für Biologie im Reaktorzentrum Seibersdorf, durch deren liebevolle menschliche Art meine Arbeit mit beeinflußt wurde.

LEBENS LAUF

Am 29. Mai 1951 wurde ich, Klaus Bauer, als Sohn des Dr. med. Rudi Bauer, Arzt für Allgemeinmedizin und seiner Ehefrau Dr. med. Dorothea Bauer, Ärztin für Allgemeinmedizin in Augsburg geboren.

Ab Herbst 1957 besuchte ich in Köln für vier Jahre die Volksschule und wechselte 1961 auf den humanistischen Zweig des Höderlin-Gymnasiums, Köln-Mülheim, wo ich 1970 die Reifeprüfung ablegte.

Im selben Jahr begann ich das Studium der Medizin an der Universität Gent in Belgien.

In Köln absolvierte ich im März 1972 das Vorphysikum, wechselte anschließend nach München über, wo ich im Oktober 1973 das Physikum bestand.

Nach zwei klinischen Semestern in Wien und vier klinischen Semestern in München, beabsichtige ich im Herbst 1976 mein Staatsexamen abzulegen.

